FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Wilms' Tumor 1 (WT1) Protein
Clone 6F-H2
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IS055

English

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Wilms' Tumor (WT1), Clone 6F-H2, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody is useful for the identification of Wilms tumor, acute leukemias, malignant mesothelioma, serous ovarian adenocarcinoma, granulosa cell tumor, and other tumors. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Summary and explanation

WT1 is a gene involved in the induction of Wilms' tumor, a pediatric renal malignancy. The *WT1* gene, located on chromosome 11p13, is inactivated in 5 to 10% of sporadic Wilms' tumors and nearly 100% of Denys-Drash patients, a syndrome associated with genitourinary abnormalities and Wilms' tumor. *WT1* encodes a zinc finger transcription factor which recognizes the early growth response (EGR-1) consensus sequence found in promoters of growth factor genes. The protein encoded by *WT1* regulates transcription of other genes and can function both as a transcriptional activator and repressor. WT1 has been demonstrated to repress transcription of various growth-related genes such as platelet-derived growth factor A chain (*PDGF-A*) and insulin-like growth factor (*IGF*) (3-5). The transcriptional activity of this protein, however, can be modulated through physical interactions between WT1 and p53. In the absence of wild-type p53, WT1 has been demonstrated to function as a transcriptional activator of the *EGR-1* promoter in transfection assays (6).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L NaN_3.

Clone: 6F-H2 Isotype: IgG1, kappa

Immunogen

Truncated human WT1 protein corresponding to N-terminal amino acids 1–181 (1,2)

Specificity

Alternate splicing of the *WT1* transcript gene results in four distinct mRNA species which are present in different amounts. The predicted molecular weight of the WT1 protein ranges from 46 to 49 kDa depending on the mRNA species however, the WT1 proteins derived from cells migrate at 50 to 55 kDa in SDS-PAGE (4). This antibody recognizes an epitope found in the amino terminal 84 encoded amino acids of WT1. It reacts with all isoforms of the full-length WT1 and also identifies WT1 lacking exon 2, frequently found in subsets of sporadic Wilms' tumors. In immunoprecipitation assays, the antibody has been shown to recognize full-length and *in vitro* translated WT1. It also detects full-length denatured WT1 (55 kDa) in Western blots of WT1 baculovirus-infected cell lysates (1).

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation including materials required but not supplied

The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012/K8014).

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide.

Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012/K8014). The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 °C; epitope retrieval temperature and time: 97 °C for 20 (±1) minutes; cool down to 65 °C. Rinse sections with diluted room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012).

Paraffin-embedded sections: As alternative specimen preparation, both deparaffinization and epitope retrieval can be performed in the PT Link using a modified procedure. See the PT Link User Guide for instructions. After the staining procedure has been completed, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Dako Silanized Slides (Code S3003) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied

The recommended visualization system is EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: FLEXRTU2 (200 uL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 uL dispense volume)

Autoprogram (without counterstaining): WT1 or Autoprogram (with counterstaining): WT1H

The Auxiliary step should be set to “rinse buffer” in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to “none.” This ascertains comparable wash times.

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator’s Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in “Performance characteristics.”

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include epithelial cells and the majority of the smooth muscle cells and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in “Performance characteristics” in all positive specimens. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS750).

Staining interpretation

The cellular staining pattern is cytoplasmic and/or nuclear; however only nuclear staining is relevant.

Performance characteristics

Normal tissues: *WT1* mRNA is strongly expressed in mesenchymally derived tissue. During embryonic development, *WT1* expression has been observed in human kidney, spleen, and gonadal ridge mesoderm and the mesothelial lining of the coelomic cavity and the organs contained within (7). *WT1* gene expression in adult human tissues has been observed in sertoli cells of testes, decidual cells of the uterus and in granulosa cells of the ovary. A number of other adult tissues were shown to contain *WT1* transcripts including pleura, spleen, heart, foreskin, endometrium, and glomerular epithelium of the kidney (7,8) Antibodies to WT1, including clone 6F-H2, have been demonstrated to label the cytoplasm in some tissue specimens. Cytoplasmic staining of blood vessels and connective tissue of lung alveoli were observed to stain positively (8). Granular cytoplasmic staining has also been reported in mature myelocytic cells (11).

Abnormal tissues: High levels of WT1 expression have been demonstrated in the epithelial and blastemal components of Wilms’ tumors, whereas stromal elements were found to be expressed at very low levels (10). The majority of malignant mesotheliomas were found to strongly express *WT1* mRNA and also the gene product. The WT1 protein was immunolocalized, using anti-WT1 (clone 6F-H2), to the nuclei of malignant mesothelioma cells (8,9). WT1 gene and protein expression have also been demonstrated in the majority of acute leukemias but not in cells from chronic myelogenous leukemia, except when in blast crisis. The antibody labeled the nuclei of

leukemia blast cells but was unreactive with normal mononuclear cells and normal peripheral CD34+ hematopoetic progenitor cells (1,11). *WT1* mRNA expression has been reported in a number of other tumors including melanomas, ovarian cancer and sex cord-stromal tumors (11-13). In addition to specific nuclear immunoreactivity, antibodies to WT1 (including clone 6F-H2) have been reported to stain the cytoplasm of tumor cells in some cases of adenocarcinoma and the desmoplastic stroma and basement membrane of some carcinoma specimens. Perinuclear staining of tumor cells in malignant mesothelioma has also been observed (9). This cytoplasmic staining may represent cross-reactivity with an epitope unrelated to WT1 (9,11).

Français — Réf. IS055

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Wilms' Tumor (WT1), clone 6F-H2, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus. Cet anticorps est utile pour l'identification des tumeurs de Wilms, des leucémies aiguës, des mésothéliomes malins, des adénocarcinomes ovariens séreux, des tumeurs de la granulosa et des autres tumeurs. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Résumé et explication

WT1 est un gène impliqué dans l'induction de la tumeur de Wilms, cancer rénal de l'enfant. Le gène *WT1*, situé sur le chromosome 11p13, est inactivé dans 5 à 10 % des tumeurs de Wilms isolées et dans près de 100 % des cas de syndrome de Denys-Drash, syndrome associé à des anomalies de l'appareil urogénital et à une tumeur de Wilms. *WT1* code pour un facteur de transcription à doigts de zinc qui reconnaît la séquence consensus du gène de croissance à réponse précoce (EGR-1) présente dans les promoteurs des gènes du facteur de croissance. La protéine codée par le *WT1* régule la transcription d'autres gènes et peut agir à la fois comme un activateur et comme un répresseur de transcription. Il a été prouvé que le WT1 agit comme un répresseur de transcription de plusieurs gènes liés à la croissance tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes, chaîne A (*PDGF-A*) et le facteur de croissance insulinomimétique (*IGF*) (3-5). L'activité de transcription de cette protéine peut toutefois être modulée par des interactions physiques entre le WT1 et la p53. En l'absence de p53 de type sauvage, il s'avère que le WT1 agit comme un activateur de transcription du promoteur d'*EGR-1* dans les essais de transfection (6).

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : 6F-H2 Isotype : IgG1, kappa

Immunogène

Protéine humaine WT1 tronquée correspondant à la séquence N-terminale des acides aminés 1–181 (1,2)

Spécificité

L'épissage alternatif du gène de transcription *WT1* donne quatre espèces distinctes d'ARNm présentes en différentes quantités. Le poids moléculaire prévu de la protéine WT1 est compris entre 46 et 49 kDa selon les espèces d'ARNm, cependant, les protéines WT1 dérivées des cellules migrent entre 50 à 55 kDa avec SDS-PAGE (4). Cet anticorps reconnaît un épitope situé sur les 84 acides aminés terminaux de WT1. Il réagit à tous les isoformes de WT1 pleine longueur et identifie également un exon 2 dépourvu de WT1, fréquemment observé dans les sous-ensembles de tumeurs de Wilms isolées. Dans les dosages par immunoprécipitation, il a été démontré que l'anticorps reconnaît la WT1 pleine longueur ayant subi une traduction *in vitro*. Il détecte également la WT1 pleine longueur dénaturée (55 kDa) lors de Western blots de lysats cellulaires de WT1 infectés par baculovirus (1).

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Le prétraitement avec un démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8012/K8014).

Coupes déparaffinées : Le pré-traitement des coupes de tissus déparaffinés fixés au formol et inclus en paraffine est recommandé à l'aide du Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link.

Suivre la procédure de pré-traitement indiquée dans la notice pour la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8012/K8014). Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : Température de préchauffage : 65 °C; température et durée de restauration de l'épitope : 97 °C pour 20 (±1) minutes ; laisser refroidir jusqu'à 65 °C. Rincer les coupes avec un EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x), dilué à température ambiante (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8012).

Coupes incluses en paraffine : Comme préparation alternative des échantillons, le déparaffinage et la restauration de l'épitope peuvent être réalisés dans le PT Link à l'aide d'une procédure modifiée. Se référer aux instructions du Guide d'utilisation du PT Link. Une fois que la procédure de coloration est terminée, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ou lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames Dako Silanized Slides (Réf. S3003).

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni

Le système de visualisation recommandé est le EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8012). Les étapes de coloration et d'incubation sont préprogrammées dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume de distribution de 200 µl) ou FLEXRTU3 (volume de distribution de 300 µl)

Autoprogram (sans contre-coloration) : WT1 ou Autoprogram (avec contre-coloration) : WT1H

L'étape Auxiliary doit être réglée sur « rinse buffer » lors des cycles de coloration avec ≤10 lames. Pour les cycles de coloration de >10 lames, l'étape Auxiliary doit être réglée sur « none ». Cela confirme des temps de lavage comparables.

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la re-programmation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide d'hématoxyline EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). L'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Le contrôle de tissu positif doit comprendre les cellules épithéliales et la majorité des cellules du muscle lisse, et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » pour tous les échantillons positifs. Le contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. IS750).

Interprétation de la coloration

Le schéma de coloration cellulaire est cytoplasmique et/ou nucléaire ; cependant, seule la coloration nucléaire est pertinente.

Caractéristiques de performance

Tissus sains : L'ARNm de la *WT1* est fortement exprimé dans le tissu mésenchymateux dérivé. Au cours du développement embryonnaire, une expression de *WT1* a été observée dans le mésoderme du rein, de la rate et de la crête gonadique humains et la lignée mésothéliale de la cavité coelomique et des organes situés dans celle-ci (7). Dans les tissus sains adultes, le gène *WT1* a été exprimé dans les cellules de Sertoli du testicule, les cellules déciduales de l'utérus et dans la granulosa de l'ovaire. Plusieurs autres tissus adultes se sont avéré contenir des produits de transcription *WT1* notamment la plèvre, la rate, le cœur, le prépuce, l'endomètre et l'épithélium glomérulaire du rein (7,8). Des anticorps anti-WT1, dont le clone 6F-H2, ont marqué le cytoplasme dans certains échantillons de tissus. Une coloration cytoplasmique positive a été observée dans les vaisseaux sanguins et le tissu conjonctif des alvéoles pulmonaires (8). Une coloration cytoplasmique granulaire a également été observée dans les cellules myélocytaires matures (11).

Tissus tumoraux : Des niveaux d'expression de WT1 élevés ont été observés dans les composants épithéliaux et blastémaux des tumeurs de Wilms, tandis que les éléments stromaux étaient exprimés à des taux très faibles (10). La majorité des mésothéliomes malins exprime fortement l'ARNm du *WT1* ainsi que le produit génique. La protéine WT1 a été immunolocalisée, à l'aide de l'anticorps anti-WT1 (clone 6F-H2), sur les noyaux des cellules de mésothéliome malin (8,9). L'expression du gène WT1 et de la protéine a également été démontrée dans la majorité des leucémies aiguës mais pas dans les cellules de leucémie myélogène chronique, sauf en cas de crise blastique. L'anticorps a marqué les noyaux des cellules blastiques de leucémie mais n'a pas réagi aux cellules mononucléaires et aux cellules souches hématopoïétiques CD34+ périphériques normales (1,11). L'ARNm du *WT1* a été exprimé dans plusieurs autres tumeurs, notamment des mélanomes, des cancers de l'ovaire et des tumeurs stromales du cordon sexuel (11-13). Outre une immunoréactivité nucléaire spécifique, les anticorps anti-WT1 (dont le clone 6F-H2) ont marqué le cytoplasme de cellules tumorales dans certains cas d'adénocarcinomes et le stroma desmoplastique et la membrane basale de certains échantillons de carcinomes. Une coloration périnucléaire de cellules tumorales a également été observée dans des mésothéliomes malins (9). Il est possible que ce marquage cytoplasmique représente une réactivité croisée à un épitope sans relation avec WT1 (9,11).

Deutsch

Code-Nr. IS055

Zweckbestimmung

Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Wilms' Tumor (WT1), Clone 6F-H2, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper eignet sich zur Identifizierung des Wilms-Tumors, akuter Leukämien, maligner Mesotheliome, seröser Eierstock-Adenokarzinome, Granulosazelltumore sowie weiterer Tumore. Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Zusammenfassung und Erklärung

WT1 ist ein Gen, das an der Einleitung des Wilms-Tumors, einer Nieren-Malignität bei Kindern, beteiligt ist. Das *WT1*-Gen, das sich auf dem Chromosom 11p13 befindet, ist bei 5 bis 10 % der sporadischen Wilms-Tumore inaktiviert und bei annähernd 100 % der Denys-Drash-Patienten, einem bei Abnormalitäten im Genitalbereich und Wilms-Tumor auftretenden Syndrom. *WT1* kodiert einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der die frühe Wachstumsreaktions- (EGR-1) Konsenssequenz erkennt, die in Promotoren von Wachstumsfaktorgenen nachweisbar ist. Das von *WT1* kodierte Protein reguliert die Transkription anderer Gene und kann als transkriptionaler Aktivator und Repressor verwendet werden. WT1 hat gezeigt, dass es die Transkription verschiedener wachstumsbezogener Gene, z. B. die von Thrombozyten abgeleitete Wachstumsfaktor-A-Kette (*PDGF-A*) und der insulinähnliche Wachstumsfaktor (*IGF*), hemmen kann (3–5). Die transkriptionale Aktivität dieses Proteins kann allerdings durch physikalische Interaktionen zwischen WT1 und p53 moduliert werden. In Abwesenheit des p53-Wildtyps wurde nachgewiesen, dass WT1 als ein transkriptionaler Aktivator des *EGR-1*-Promotors in Transfektionsassays funktioniert (6).

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger, monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L NaN_3 enthält.

Klon: 6F-H2 Isotyp: IgG1, Kappa

Immunogen

Gekürztes menschliches WT1-Protein, das den N-Terminal-Aminosäuren 1–181 entspricht (1,2)

Spezifität

Alternatives Splicing der *WT1*-Transkript-Gene führt zu vier verschiedenen mRNA-Spezies in unterschiedlichen Mengen. Das erwartete Molekulargewicht des WT1-Proteins liegt, abhängig von der mRNA-Spezies, zwischen 46 und 49 kDa. Allerdings migrieren die von Zellen abstammenden WT1-Proteine bei 50 to 55 kDa in SDS-PAGE (4). Dieser Antikörper erkennt ein Epitop, das in den Terminal-84-kodierten Aminosäuren von WT1 angetroffen werden kann. Er reagiert mit allen Isoformen des WT1 in voller Länge und identifiziert zudem WT1 mit fehlendem „Exon 2“, das häufig in Teilmengen des sporadischen Wilms-Tumors auftritt. In Immunpräzipitationsassays wurde aufgezeigt, dass der Antikörper das WT1 in voller Länge und *in vitro* translatiertes WT1 erkennt. Er erkennt auch denaturiertes WT1 (55 kDa) in voller Länge in Western-Blots von in mit dem Baculovirus infizierten WT1-Zelllysaten (1).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in als ungefährlich eingestuften Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Die Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) ist erforderlich. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8012/K8014) erzielt werden.

Entparaffinierte Schnitte: Die Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte sollte mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) erfolgen. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch.

Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8012/K8014) durchführen. Für PT Link sollten die folgenden Parameter verwendet werden: Vorwärmtemperatur: 65 °C; Temperatur und Zeit für Epitopdemaskierung: 97 °C für 20 (±1) Minuten; auf 65 °C abkühlen lassen. Schnitte mit auf Raumtemperatur gebrachtem, verdünntem EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8012) abspülen.

Paraffineingebettete Schnitte: Zur Probenpräparation kann für Entparaffinierung und Epitopdemaskierung im PT Link auch ein modifiziertes Verfahren verwendet werden. Weitere Informationen siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Fixiermittels auf die Objektträger aufgebracht werden.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von Dako Silanized Slides (Code-Nr. S3003) empfohlen.

Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Das empfohlene Visualisierungssystem ist EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8012). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrix-Protokoll: FLEXRTU2 (200 µl Abgabevolumen) oder FLEXRTU3 (300 µl Abgabevolumen)

Autoprogram (ohne Gegenfärbung): WT1 oder Autoprogram (mit Gegenfärbung): WT1H

Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der „Zusatz“-Schritt auf „Pufferspülgang“ eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den „Zusatz“-Schritt auf „Keine“ einstellen. Dies gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den Technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität

wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Empfohlen wird ein nichtwässriges, permanentes Fixiermittel.

Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Das positive Kontrollgewebe sollte Epithelzellen enthalten und die Mehrheit der glatten Muskelzellen und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativ-Kontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS750).

Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster ist zytoplasmatisch und/oder nukleär, allerdings ist nur die nukleare Färbung relevant.

Leistungsmerkmale

Gesundes Gewebe: *WT1* mRNA wird stark in vom Mesenchym abstammenden Gewebe exprimiert. Während der embryonalen Entwicklung wurde die *WT1*-Expression in der menschlichen Niere, der Milz und im Gonaden-Mesoderm und der Mesothelschicht des Coeloms und der darin enthaltenen Organe beobachtet (7). In adultem Humangewebe wurde die WT1-Gen-Expression in Sertoli-Zellen der Hoden, in Dezidualzellen des Uterus und in Granulosazellen der Eierstöcke beobachtet. Andere adulte Gewebeproben von Pleura, Milz, Herz, Vorhaut, Endometrium und glomerularem Nierenepithel enthalten *WT1*-Transkripte (7,8). Es wurde nachgewiesen, dass Antikörper gegen WT1, einschließlich Klon 6F-H2, das Zytoplasma in einigen Gewebeproben markieren können. Die Färbung des Zytoplasmas bei Blutgefäßen und beim Bindegewebe der Lungenalveolen wurde positiv wahrgenommen (8). Eine granuläre zytoplasmatische Färbung wurde auch bei reifen Myelozyten festgestellt (11).

Pathologisches Gewebe: In den Epithel- und Blastem-Komponenten des Wilms-Tumors wurde ein hohes Maß an WT1-Exprimierung nachgewiesen, wohingegen Stromaelemente nur sehr gering nachweisbar waren (10). Die meisten malignen Mesotheliome haben *WT1* mRNA sowie das Gen-Produkt stark exprimiert. Das WT1-Protein wurde mit Anti-WT1 (Klon 6F-H2) an die Zellkerne der malignen Mesothelzellen immunolokalisiert (8,9). Eine WT1-Gen- und Protein-Exprimierung wurde ebenfalls bei der Mehrheit der akuten Leukämien nachgewiesen, aber nicht in Zellen von chronischer myelogener Leukämie mit Ausnahme der Blastenkrise. Der Antikörper hat den Kern der leukämischen Blastenzellen markiert, war aber nicht reaktiv mit gesunden mononukleären Zellen und gesunden peripheren CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen (1,11). Eine *WT1* mRNA-Exprimierung wurde auch bei zahlreichen anderen Tumoren einschließlich Melanomen, Eierstockkarzinomen und Keimstrang-Stromatumoren, beobachtet (11–13). Zusätzlich zur spezifischen nukleären Immunreaktivität wurde beobachtet, dass Antikörper auf WT1 (einschließlich Klon 6F-H2) in einigen Fällen des Adenokarzinoms und der desmoplastischen Stroma- und Basalmembran einiger Karzinomproben das Zytoplasma dieser Tumorzellen färben. Eine perinukleäre Färbung der Tumorzellen in malignen Mesotheliomen konnte ebenfalls festgestellt werden (9). Diese zytoplasmatische Färbung kann seine Ursache in einer Kreuzreaktivität mit einem Epitop haben, das keinen Bezug zu WT1 hat (9,11).

References
Bibliographie
Literaturangaben

1. Rauscher JF, et al. Submitted for publication.
2. Menssen HD, et al. Presence of Wilms' tumor (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. Leukemia 1995; 9:1060
3. Coppes MJ, et al. The role of WT1 in Wilms tumorigenesis. FASEB J 1993; 7:886
4. Haber DA and Buckler AJ. WT1: A novel tumor suppressor gene inactivated in Wilms' tumor. New Biol 1992; 4(2):97
5. Rauscher FJ. The WT1 Wilms tumor gene product: A developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. FASEB J 1993; 7:896
6. Maheswaran S, et al. Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:5100
7. Pritchard-Jones K, et al. The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary development. Nature 1990; 346:194
8. Amin KM, et al. Wilms' tumor 1 susceptibility (WT1) gene products are selectively expressed in malignant mesothelioma. Amer J Pathol 1995; 146(2):344
9. Kumar-Singh S, et al. WT1 mutation in malignant mesothelioma and WT1 immunoreactivity in relation to p53 and growth factor receptor expression, cell-type transition, and prognosis. J Pathol 1997; 181:67
10. Varansi R, et al. Fine structure analysis of the WT1 gene in sporadic Wilms tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:3554
11. Menssen HD, et al. Detection by monoclonal antibodies of the Wilms' tumor (WT1) nuclear protein in patients with acute leukemia. Intl J Canc 1997; 70:518
12. Bruening W, et al. Analysis of the 11p13 Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in ovarian tumors. Canc Invest 1993; 11(4):393
13. Rodeck U, et al. Expression of the WT1 Wilms' tumor gene by normal and malignant human melanocytes. Intl J Canc 1994; 59:78

REF — Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	IVD — In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum
Manufacturer Fabricant Hersteller	LOT — Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	Σ — Contains sufficient for <N> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für ‚n' Ansätze
Use by Utiliser jusque Verwendbar bis	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	EC REP — Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU

PT0020/ Rev C

Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

EC REP
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595

www.dako.com

Edition 09/07